

溶血性連鎖球菌 Animal C の外毒素に関する研究

愛知縣衛生研究所(所長 増山忠俊)

(指導 東大名譽教授 細谷省吾)

横 森 由 伸

目 次

緒 言

實 験

I 毒素の産生

- (1) 使用菌株
- (2) 培 地
- (3) 培養法
- (4) 毒素の毒性

II 毒素の部分的精製

III 部分的精製毒素の毒性

- (1) マウスに対する毒性
- (2) ウサギに対する毒性

IV 毒素の無毒化

V 毒素の免疫原性(抗毒原性)

- (1) ウサギ免疫血清の毒素中和能
- (2) 毒素による感染防禦効果
- (3) トキソイドによる感染防禦効果

總括並に結言

文 獻

緒 言

従来、溶血性連鎖球菌(以下“溶連菌”と略記)に関しては、A群溶連菌を中心として多くの業績があり、特に分類に関する研究、各群菌の病原性に関する業績が多數を占めている。LancefieldのC群中、特にAnimal Cに関してはBoxmyer¹⁾, Horne²⁾, Feldman³⁾, Megrail⁴⁾, Beatlie⁵⁾, Rae⁶⁾, Seastone⁷⁾, Sherman⁸⁾, 小倉⁹⁾, 越智¹⁰⁻¹¹⁾, 齋藤¹⁴⁾, 有馬¹⁵⁾, 伊藤¹⁶⁾, 上田¹⁷⁾, 生田¹⁸⁾, 今泉¹⁹⁾等の業績がある。この菌による疾患がウサギ、モルモット、マウス等の実験用動物に廣汎な流行をなした事實については、夙に外國に於て報告されたが、我が國に於ても、1949年京都に於けるジフテリア豫防注射禍事件が起り之が調査と生物學的

製劑檢定のため、アメリカより數千匹のモルモットを空輸により輸入した際に、その過半數が本菌の感染により斃死した。以來この病原菌が國內に蔓延して需要供給の両面に與えた損害は甚大であつたのみならず、この病氣は國內に土着し、病獸は絶えたことはない。更に最近、淺川²⁰⁾等により、この菌による人体感染例の記載を見るに及んで、本菌感染に對する豫防乃至治療の研究がますます重要視されるに至つた。

翻つて溶連菌を原因とする疾患の豫防に関する業績を按ずるに、猩紅熱の豫防に、A群溶連菌のerythrogenic toxinのホルモルトキソイドが廣く實用化され、豫防の實効を擧げた以外には、他の群菌に關しては明瞭な確證なく、特にAnimal Cに關してはLoewenthal²¹⁾ 梅野²²⁾, 越智²³⁾等の菌体免疫に關する業績及び、別に田島²⁴⁾²⁵⁾等が皮膚反應による感染の診斷について研究し、いづれも適確な方法のないことを報じている。

筆者はAnimal Cの代謝物質から感染防禦に關する抗原を見出さんとして細谷指導の下に次の如き研究を行い興味ある知見を得たので之を記載するものである。

實 験

I 毒素の産生

先づ溶連菌Animal Cの液狀培養濾液について毒性ありや否やを知らんとして次の如き實驗を試みた。

(1) 使用菌株—傳研田島より分與されたG23株及び、當所飼育中のモルモットの肥大した頸部淋巴腺から分離された野々村株の2株を用いた。それらの生物學的性状はLancefieldのC群、小林分類II a型、越智分類II型に該當した。

(2) 培地—牛肉の醋酸浸出液及びポリペプトン透析外液培地, 牛肝臓水浸出液及びポリペプトン培地, 牛肉水と牛肝臓水浸出液及びポリペプトン培地, 馬肉水と馬肝臓水浸出液及びポリペプトン培地, 馬肉水又は牛肉水とポリペプトン培地, 豚胃自家消化の Martin ブイオン培地, 牛肉水と牛心臓及び豚胃のペプシン消化液培地, 牛肉水と牛肝臓のペプシン消化液等を夫々主成分とする各種の培地を用いたが, その中比較的著明にウサギの皮内反応物質を證明したのは安川培地²⁶⁾ Martin ブイオン培地, 肝臓消化培地などであった。この實驗を通じ主として用いられたのは牛肝臓消化培地であるから次にその製法について述べる。新鮮な肝臓を細挫し, その重量の約5倍に相當する温水(50°C)を加え, 鹽酸でpH 2としペプシン(武田製)を0.1%の割に加え時々攪拌しながらpHを2に修正して50°Cに保ち乍ら, 一夜放置した後, 内液が80°Cになる迄加熱し濾過した。濾液には常法によつてつくられた牛肉水を等量に加え, 鹽化ナトリウムを0.5%に添加, 煮沸しながらpHを7.4に修正し冷却後再び濾過して長頸コルベン(破傷風毒素生産用)の頸部まで分注し, 120°C 20分高壓滅菌後, 流動パラフィン(高壓滅菌した)を約2cmの高さに重層し, 24時間37°Cに保ち, 雜菌の混入していない事を確めた。

(3) 培養法

保存菌株を綿羊血液寒天に移植して生じた Dawson のS型集落(Toddの光澤型集落)を肝マブイオン(10cc分注)に接種し, 36°C 18時間培養の2cc宛を前記の培地に36°C 5日間培養の後, 血液寒天平板及び普通寒天斜面に移植して雜菌を含まない事を確めた。

(4) 毒素の毒性

各培養から流動パラフィンを除き Seitz(E.K.)を通じて無菌濾液とし, pH測定後, 生理食鹽水で倍數稀釋し 0.1cc宛をウサギの毛を刈つた背部皮内に注射して, 24時間目と48時間目とに觀察した。培地の種類によつて程度の差はあるが, 18時間以内に發赤, 腫脹, 硬結が出現し水泡を認めたものもあつたが, 2日以後には皆減退の傾向を示

した。對照として菌を培養しない培地を注射した局所には, 全然無反應か或は僅微の發赤を生じたのみで, 培養濾液注射局所の反應との間に著明な相違を認めた。

別に60°C30分又は85°C30分加熱された培養濾液を注射したがその成績は表(1)に示されたように, 培養濾液の毒性は60°C或は85°Cの加温により明かに減弱を示すことが判つたが, 耐熱性については, 後日毒素の精製の程度が進んでから嚴格に再検討したい。

表1 培養濾液のウサギ皮内反應
(牛肝消化培地)

稀釋 培養濾液	1× (mm)	10× (mm)	100× (mm)	1,000× (mm)
非加熱	22×21	5×13	9×9	4×4
60°C 30分	10×8	6×5	0	0
85°C 30分	8×7	4	0	0
對照 (培養前)	4×3	0	0	0

II 毒素の部分的精製

猩紅熱患者から分離されたA群溶血性連鎖球菌毒素を細谷宮田法²⁷⁾によつて處理した報告はかつて安東²⁸⁾等によつて行われたが, 筆者は Animal C 溶連菌の培養濾液を細谷法²⁹⁾によつて處理した各分割を實驗に供した。

即ち培養濾液(Aと略稱する)を中和し50g/dl鹽化亜鉛溶液の $\frac{1}{20}$ 量を加え, 遠心を行い上清を傾斜し, 沈澱を水洗した後, 10%磷酸ナトリウム(培養濾液の $\frac{1}{10}$ 量)を以て約30°Cに加温, 振盪後遠心し上清即ち溶出液を牛腸膜囊に容れ, トルオールを重層し乍ら烈しい流水中に8時間加壓透析を行い, 内液(その一部に50%トリクロール醋酸液を滴加していつたが pH 3迄には沈澱は出來なかつた)をビーカーに移した。これを(B)と略稱する。

(B)を2等分し先づその1半に硫酸安門飽和水溶液を pH 7に保ち乍ら加えて行つたが, $\frac{1}{3}$ 飽和迄は沈澱を生じなかつた。 $\frac{2}{3}$ 飽和ではじめて沈澱を生じたので37°Cに1時間おき遠心して沈澱と上清とに分ち, 沈澱を濾紙ではさんで水分を去つた後少量の蒸留水に溶し48時間流水透析を行

つた後、内液に純エタノール2倍量を加えて沈澱を起させ、上清を分け、沈澱を鹽化カルシウム上で減壓乾燥させて(C)分割となした。上清には更に硫酸を加えて80%飽和としたが沈澱を生じなかつたので、更に追加して全飽和としても沈澱が出来なかつた。そこで此の全飽和液を48時間烈しい流水中で透析した後に純エタノール8倍量を加えて沈澱を起させ、上清を分けて、沈澱は鹽化カルシウム上で減壓乾燥し(D)分割となした。

(B) 即ち内液の残り半分量に鹽化ナトリウムを0.5%に溶かし、純エタノール2倍量を加え、速心して沈澱と上清とに分け、沈澱は鹽化カルシウム上で乾燥し(E)分割となし、上清には純エタノールを更に2倍量加え、速心して上清と沈澱とに分け、沈澱は同じように乾燥して(F)分割となし、その上清に更に純エタノール10倍量を加えて沈澱と上清とに分け、沈澱は乾燥して(G)分割となした。

III 部分的精製毒素の毒性

この菌の無菌的培養濾液が、ウサギの皮内に反應を示す事は上述した通りであるが、部分的精製の後に如何なる毒性を示すかを知るために次の實驗を行つた。

(1) マウスに対する毒性

粗毒素(無菌的培養濾液)及び部分的精製毒素(B)を生理食鹽水で10進法稀釋して、その0.3cc宛をdd系12g内外のマウス各5匹宛の静脈内に注射した處、粗毒素を注射したものは、注射直後に苦悶の状を呈し始め10數分にして恢復しその後は異狀を認めなかつたが、後者の0.3ccは5匹中4匹、0.03ccは5匹中1匹が7日以内に斃れた。一方對照として菌を培養しなかつた培地の注射をうけたマウスは何等異狀はなかつた。

故に致死毒として弱い乍らも、明に毒性が精製濃縮によつて證明出来るようになった。

(2) ウサギに対する毒性

体重1,500g内外のウサギの背部皮内に前記培養濾液(A)及び部分的精製分割(B)~(G)を夫々液狀は0.1cc,粉末は生理食鹽水にとかし原量の0.1cc相當量宛を注射して反應を觀察した。

成績は表(2)に示す如く(A)及び(B)(C)(E)の精製各分割は明に著明な發赤、腫脹、硬結を現はした。このことにより、ウサギの皮内に反應を起すこの毒素は細谷法により精製可能であつて、純エタノール2倍量で沈澱し、硫酸の2/3飽和で沈澱するものであることが判つた。

表2 精製行程中の各分割のウサギ皮内反應(3匹の平均發赤徑)

稀釋 毒素分割	1× (mm)	10× (mm)	100× (mm)	1,000× (mm)
(A)	10×20	10×9	4×5	0
(B)	35×30	20×10	0	0
(C)	35×25	20×8	8×4	0
(D)	10×8	0	0	0
(E)	30×15	20×17	10×4	5×5
(F)	15×10	0	0	0
(G)	0	0	0	0

IV 毒素の無毒化

本菌の培養濾液或は部分的に精製された濾液中にマウスを斃し或はウサギの皮内に反應を起す毒素を含有する事が證明されたが、この毒素は一般の外毒素(Exotoxin)の如くホルマリンに依つてトキシイド化され得るものであるかどうかを決定するためにエチル水銀チオサリチレート處理毒素を對照に用いて實驗を行つた。

即ち肝臟消化培養の無菌的濾液(粗毒素液と略記する)及び之を細谷法で處理したもの、各10cc宛を數本の試験管に分注して局方ホルマリンを0.5%に加えた後、夫々pH 6.0, 7.5, 8.5に修正しゴム栓を附して37°Cに放置した。また一方に於て同一條件にてエチル水銀チオサリチレート(武田製マーゾニン)を0.02%の割に加えて37°Cにおき夫々時々汲出して、ウサギの皮内に注射して毒性を比較し、同時にマウスの静脈内に注射して數日間觀察した。その成績は表(3)に示すように、ホルマリンを添加したものは粗毒素液も、精製毒素もともに、pH 6.0では變らなかつたが、pH 7.5のものは兩者ともに、第2、第3日目と稍々酸性に傾いたので、その都度夫々pH 7.5に修正し37°Cに保存したが第4日目よりpHの値は安定した。

表 3 無 毒 化 試 験

毒素別	添 加	保温	pH の 變 化				ウサギ皮内 0.1cc		pH の變化			ウサギ皮内 0.1cc	
			起始	2日	3日	4日	稀釋	反應(mm)	5日	7日	10日	稀釋	反應(mm)
粗 毒 素	ホルマリン 0.5%	37°C	6.0	→			1×	(-)	6.0	→			
							10×	(-)					
			7.5	7.2	7.4	7.5	1×	(-)	7.5	→			
						10×	(-)						
		8.5	7.8	8.2	8.5	1×	(-)	8.5	→				
						10×	(-)						
			5°C	6.6	→			1×	20×25	6.6	→	1×	25×15
	マ ー ゾ ニ ン 0.02%	37°C	6.0	→			1×	10×9	6.0	→			
							10×	(-)					
			7.5	→			1×	8×8	7.5	→			
						10×	(-)						
8.5	→			1×	9×8	8.5	→						
				10×	(-)								
精 製 毒 素	ホルマリン 0.5%	37°C	6.0	→			1×	(-)	6.0	→			
							10×	(-)					
			7.5	7.2	7.2	7.5	1×	(-)	7.5	→			
						10×	(-)						
		8.5	8.0	8.5	8.5	1×	(-)	8.5	→				
						10×	(-)						
			5°C	7.2	→			1×	35×25	7.2	→	1×	30×20
	マ ー ゾ ニ ン 0.02%	37°C	6.0	→			1×	20×25	6.0	→			
							10×	10×5					
			7.5	→			1×	10×20	7.5	→			
						10×	4×8						
8.5	→			1×	15×16	8.5	→						
				10×	(-)								

pH 8.5の粗毒素液は第2, 第3日目に, 又同じpH 8.5の精製毒素液の方は第2日目に酸性に傾いたから最初のpHに修正し其の後は變らなかつた。

その結果37°C 4日の後に夫々 0.1ccをウサギの皮内に注射したところ, 何等の反應を認めなかつたので, 純エタノールの2倍量を加えて, 沈澱させ真空乾燥後, 原毒素に換算して1ccを含むように生理食鹽水に溶してその 0.3ccを体重12gr 内外の dd 系マウスの静脈内に注射しても何等異常を認めなかつた。

一方對照のマーゾニン處理の粗毒素液, 精製毒素はともにpHの變動もなく37°C 4日後, 11日後にウサギの皮内に 0.1ccを注射すれば明かに發赤, 腫脹等の反應の出現を認めた。

以上の實驗により本毒素はホルマリンによつて短時日に無毒化せられることが證明された。これらのことからこの菌の培養濾液中に外毒素の存在が肯定されるものである。

V 毒素の免疫原性 (抗毒原性)

本菌疾患の豫防或は免疫學的研究については, 先にも述べたように, その報告例が少く特に毒素より出發した免疫については, まだ文獻は見當らないので粗毒素及び部分的精製毒素, 並に後者をホルマリンで無毒化したものについて, ウサギ, マウスに對する免疫原性の有無を試みた。

(1) ウサギ免疫血清の毒素中和能

体重1500g内外のウサギ4匹に, 7日間隔で, 粗毒素を1cc 2回 2cc 1回, 續いて部分的精製毒

素を3cc 2回静脈内に注射して最終注射1週間後に型の如く採血し、夫々56°C30分加熱非働化した4匹のウサギ免疫血清の夫々に粗毒素(無菌的培养濾液)、部分的精製毒素、及び後者を純エタノール2倍量添加し沈澱させた分割の溶液(精製毒素2倍換算量)の等量を加え室温30分放置後、0.2ccをウサギの背部皮内に注射し、發赤、腫脹、硬結を目標として毒素中和能の有無を判定した。

對照には免疫されたことのない健康なウサギの血清に毒素を同じ条件で加えたものを用いた。

成績は表(4)に示すように對照血清は粗毒素を中和することが出来ないのに反して、4匹の免疫ウサギの血清は例外なく粗毒素を中和した。No. 105, No. 106の血清は精製毒素を中和し、No. 106の血清はアルコール沈澱毒素も中和したのに対し對照の血清は中和し得ない。但しNo. A, No. 101, No. 105の血清は抗毒素價が、使用毒素量を中和するのに足りなかつたことを示しているものであるが、明に本菌毒素は抗毒原性を有するものである。

表4 免疫血清毒素中和能 (ウサギ皮内反應)

ウサギ免疫血清	毒素	粗毒素 (照)	精製毒素 (照)	精製アルコール沈 (照)
No. A	0	10×10	10×15	
No. 101	0	10×12	15×18	
No. 105	0	0	8×15	
No. 106	0	0	0	
健康血清	10×11	30×28	40×20	

(2) 毒素による感染防禦効果

細谷等は外毒素産生菌の殆どすべてについて、生体に抗毒性免疫を賦與する時は、その生体に當該生菌攻撃を行うと雖も、ある限度はあるが確實に感染を防禦出来ることを立證した(ジフテリア菌、破傷風菌、ガスエソ原因菌、志賀赤痢菌、ブドウ球菌、バネ菌 其他³⁰⁾。筆者はこの學説が動物型C溶連菌に關して成立するかどうかを決定するために次の實驗を行った。

實驗(I)

10gr内外のdd系マウス20匹を1群とし、第1群には粗毒素液(無菌的培养濾液)0.2cc宛、第2群には部分的精製毒素の10倍稀釋0.2cc宛7日おきに2回静脈注射した。その間毎日一定時間に体重を測定したが平均体重の著しい増減は見られなかつた。

最終注射から7日目に各群を2分し、肝ブイオン37°C18時間培養を、半数には静脈内に、半数には腹腔内に注射攻撃を行い10日間觀察した。

成績は表(5)に示す如く静脈内攻撃群10匹中6匹耐過し、10日目に犠牲死させて心血、肝、脾臓から血液寒天平板培養を行ったが、菌は全く證明出来なかつた。5日目迄に感染死した残り4匹の心血からはこの菌を培養證明した。然るに對照群は5匹悉くが感染死し、全例その心血から本菌を培養證明した。

表5 感染防禦試驗(I)

免疫	生菌攻撃	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10日	結果
粗毒素	(マウス) 肝ブイオン培養生菌液 0.2cc i.v.	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	6/10
		○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	
	同上 0.5cc i.p.	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	9/10
		○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	
精製毒素	(マウス) 肝ブイオン培養生菌液 0.2cc i.v.	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	7/10
		○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	
	同上 0.5cc i.p.	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	9/10
		○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	○●●(+)	

註 生菌對照は感染防禦試驗(II)に同じ (+)心血分離菌陽性を示す

腹腔内攻撃群では対照より死期延長は見られたが、感染死を免れたものは1匹もなかつた。

精製毒素免疫群10匹に同じ条件で静脈内に生菌攻撃を行つた場合、対照は5匹共悉くが4日以内に感染死(心血から本菌を証明した)のに対し、免疫群は3匹感染死(心血より菌を証明)しただけで残り7匹は観察期間健康に終始し、11日目犠牲死させた後の心血、肝、脾臓の培養からはすべて菌は証明されなかつた。

同じ免疫群の残り10匹に攻撃を腹腔内に行つた場合には全部感染死を免れなかつた。

実験(Ⅱ)

次に粗毒素或は精製毒素 0.3cc宛を、前と同一条件の Maus 10匹宛に皮下注射による免疫処理を3回(1週間隔)行い、7日目に生菌攻撃を行つた。

成績は表(6)に示す如く粗毒素免疫に対する静脈内攻撃群の Maus 5匹は4日目と8日目に感

表6 感染防禦試験(Ⅱ)

免疫	免疫	生菌攻撃	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10日	結果	考
粗毒素	(Maus) 0.3cc	肝臓/培養 生菌液 0.3cc i.v.	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	3/5
	Sub. 3回	同上 0.5cc i.p.	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	0/5
精製毒素	(Maus) 0.3cc	肝臓/培養 生菌液 0.3cc i.v.	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	4/5
	Sub. 3回	同上 0.5cc i.p.	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1/5
対照	1x	肝臓/培養 生菌液 0.3cc i.v.	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	0/5
	10x	同上 0.3cc i.v.	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	0/5
	1x	同上 0.5cc i.p.	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	0/5
	100x	同上 0.5cc i.p.	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	0/5

註 (十) 心血分離菌陽性を示す

染死したが3匹は10日以上健存し心血、肝、脾臓の培養は陰性であつた。

腹腔内生菌攻撃マウスは対照より死期は明らかに延長せられたが5匹共攻撃後3~8日の間に感染死を遂げた。

精製毒素免疫群も静脈内生菌攻撃に対しては1匹が攻撃後7日目に感染死した以外、残り4匹はいずれも観察期間(10日)健在をつづけ、11日目犠牲死後の培養では、全例の心血、肝、脾臓から菌を培養証明出来なかつた。

腹腔内生菌攻撃に対する成績は5匹中4匹は感染死を遂げ1匹だけ10日以上健存を續けた。

(3) トキソイドによる感染防禦効果

体重10gr内外の dd 系マウス10匹を一群として部分精製毒素をホルマリンで無毒化したもの 0.5cc宛(無毒化後、純エタノール2倍量で沈澱乾燥し、無毒化前の 0.3cc相当量を生理食鹽水に溶したものを)を7日おきに3回皮下注射した。その間毎日一定時間に体重を測定したところ免疫注射終了後の体重増加は一匹平均5grであつた。

最終注射7日目にマウス群を折半して肝ブイオン18時間培養の静脈内或は腹腔内攻撃を行つたところ、表(7)に示す如く静脈内攻撃は5匹全部

表7 トキソイドの感染防禦

免疫	免疫	生菌攻撃	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10日	結果	考
無毒化精毒素	(Maus) 0.5cc	肝臓/培養 0.3cc i.v.	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	5/5
	Sub. 3回	同上 0.5cc i.p.	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	0/5
対照	1x	肝臓/培養 生菌液 0.3cc i.v.	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	0/5
	10x	同上 0.3cc i.v.	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	0/5
	1x	同上 0.5cc i.p.	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	0/5
	100x	同上 0.5cc i.p.	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	0/5

註 (十) 心血分離菌陽性を示す

が10日の觀察期間中健存したので、犠牲死させて心血、肝、脾臓を肝ブイオン、血液寒天平板を用いて、菌の分離を試みたが何れも陰性であつた。

腹腔内攻撃では對照より死期の延長を認めたのみで感染死をなした。

この(2)(3)の實驗を通じて云い得ることは毒素、トキソイド免疫マウスは生菌の静脈内攻撃に對して相當顯著な感染防禦性を賦與することが出来る。然し腹腔内攻撃の場合には静脈内攻撃の場合より免疫効果が劣ることは、腹腔内が侵入菌の増殖に適するから、侵入菌が先づそこで増殖し、從つて菌の侵襲力が免疫力を凌駕するためであろう。然しながら無菌の培養濾液より出發した粗毒素、或は精製毒素又はこれのホルマリンによつて無毒化されたものを、マウスの静脈内か、又は皮下に注射を繰返すことに依つて、何れも能動性免疫を生じて、生菌の静脈内攻撃に對しては明かに耐過が證明せられ又腹腔内攻撃に對しても對照に、比べて死期の延長を認めたことは眞に興味あることである。但し無毒化しない粗毒素、精製毒素の間に免疫力の差はなく、むしろ精製毒素の方が稍々劣るかの感は、免疫期間中体重の増加がなかつたことより推測して、精製毒素の毒性が免疫動物に及ぼした影響ではなからうかと思われる。之に反して精製毒素をホルマリンによつて無毒化したものは、体重の増量を示すと共に強力な能動性免疫による感染防禦能を顯著に示した。なお精製各分割の免疫原性については之を試みていないが、皮内反應増強の事實よりして、之等の分割の無毒化せられたものは、更に強力な免疫を與えるものと思われる。

以上の事實により溶連菌 *Animal C* の產生毒素はマウスに對して明に能動性免疫を與え得るものと信ずる。*Animal C* の生菌又は死菌を使用して感染防禦の可能性を先人が稱えていること共に、本菌の菌体成分又は其の代謝産物が生菌の攻撃を良く阻止し得ることは當然であつて、此の點については前述の如く長年に渉る細谷等の多くの業績が良くこれを證明しているところである。

總括並に結言

以上の諸實驗に依つて、溶血性連鎖球菌 *C* 群

中の *Animal C* の液狀培養濾液中にマウスを斃し、ウサギの皮内に注射すれば、發赤、腫脹、硬結を生じ、加熱によつて毒性を減じ、ホルマリンを添加し微弱アルカリ性として37°Cに保存すれば短時日に無毒化する處の有毒物質の存在を證明した。

此の有毒物質は

(1) 細谷法に依り部分的精製され、トリクロール醋酸酸性(pH 4~3)に於て沈澱せず、エチルアルコール2倍量及び硫酸安門の $\frac{2}{3}$ 飽和で沈澱する。

(2) ウサギの静脈内に反復注射後に得られた血清は該有毒物質に對する中和能力を有する。

(3) 粗毒素、部分的精製毒素並に「後者を微弱アルカリ性に於てホルマリン添加によつて無毒化したトキソイド」等を用いてマウスに對し繰返し注射することにより能動性免疫を與え或る限度はあるが確實に生菌の攻撃を阻止することが出来る。

文 獻

- 1) Boxmeyer: J. Inf. Dis, 4:657, 1907. — 2) Horne: Zent. f. Bakt. 56:698, 1913. — 3) Feldman: Amer. J. Path. 5:371, 1929. — 4) Megraill: J. Inf. Dis. 44:243, 1929. — 5) Beatlie: J. Path. & Bact. 34:453, 1931. — 6) Rae: J. Inf. Dis. 59:236, 1936. — 7) Seastone: J. Exp. Med. 70:347, 1936. — 8) Sherman: Bact. Rev. 1:1, 1937. — 9) 小倉: 細菌學雜誌, 376號, 298, 昭2. — 10) 越智: 日本獸醫學雜誌, 3, 49, 昭16. — 11) 越智: 日本獸醫學雜誌, 4:697, 昭17. — 12) 越智: 日本獸醫學雜誌, 5:73, 昭18. — 13) 越智: 日本獸醫學雜誌, 15:259, 昭28. — 14) 齋藤: 日本細菌學雜誌, 6:69, 昭26. — 15) 有馬: 日本細菌學雜誌, 6:65, 昭26. — 16) 伊藤: 日本獸醫學雜誌, 13:352, 昭26. — 17) 上田: 日本獸醫學雜誌, 14:434, 昭27. — 18) 生田: 日本細菌學雜誌, 9:139, 昭29. — 19) 今泉: 日本獸醫學雜誌, 17, 19, 昭30. — 20) 淺川: 日本細菌學雜誌, 10:713, 昭30. — 21) Loewenthal: Z. Hyg. u. Infekt. 113:445, 1931. — 22) 梅野: 北里實驗醫學, 10:18, 昭8. — 23) 越智: 日本獸醫學雜誌, 5, 233, 昭18. — 24) 田島: 日本獸醫學雜誌, 13, 352, 昭26. — 25) 田島: 日本獸醫學雜誌, 14, 434, 昭27. — 26) 安川: 細菌時報, 19號, 1, 昭28. — 27) 細谷, 宮田: 實驗醫學雜誌, 14:833, 昭5. — 28) 安東: 日本細菌學雜誌, 409號, 199, 昭5. — 29) 細谷: 實驗醫學雜誌, 28:420, 昭19; 日本醫學, 3400號, 4, 昭21. — 30) 細谷: 日本臨床, 8:473, 昭25.

Studies on the Exotoxin of Hemolytic Streptococci Animal C

Yoshinaka YOKOMORI

Public Health Laboratory, Aichi Prefecture

(Director: Dr. Tadatoshi MASUYAMA)

Directed by Hon. Professor Dr. Seigo HOSOYA

A toxic substance was demonstrated in the liquid culture filtrate of Animal C streptococci belonging to the C group hemolytic streptococci. It caused death in mice, induced reddening, swelling and induration of rabbits' skin when injected intracutaneously, reduced its toxicity by heat and was inactivated in a short time, when preserved at 37°C in a weak-alkaline medium with additional formalin. Rabbits' serum obtained after repeated intravenous injection of the substance effected neutralisation of the toxin. These results indicated an exotoxic nature of the substance. This substance per se or the toxoid prepared by an inactivation procedure with formalin could actively immunize mice when injected repeatedly, and thus protected them in a certain limit from an attack with living cocci.
